Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, 2024, p. 171-181

Detection and Complete Genome Analysis of Grapevine Deformation Virus from the Vineyards of Khorasan-Razavi Province

Z. Gholampour[1], M. Zakiaghl[2*], M. Mehrvar[2], A. Si-Ammour[3]

1 and 2- Ph.D. Student in Plant Pathology and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: zakiaghl@um.ac.ir)
3- Professor, Research and Innovation Center, Fondazione Edmund Mach, San Michele All'Adige, Italy

Received: 05-12-2023 Revised: 04-02-2024 Accepted: 07-05-2024 Available Online: 21-07-2024	**How to cite this article:** Gholampour, Z., Zakiaghl, M., Mehrvar, M., & Si-Ammour, A. (2024). Detection and complete genome analysis of grapevine deformation virus from the vineyards of Khorasan-Razavi province. *Journal of Iranian Plant Protection Research, 38*(2), 171-181. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jpp.2024.85726.1168

Introduction

More than 80 viral diseases of grapevines have been reported worldwide. The infectious degeneration disease complex causes growth reduction, stunting, shortening of internodes, bushy growth and decline in susceptible vines. Grapevine fanleaf viruses (GFLV), arabis mosaic virus (ArMV), grapevine deformation virus (GDefV), tomato ring spot virus (ToRSV) and tobacco ring spot virus (TRSV), which belong to the genus *Nepovirus*, are known to cause infectious degeneration. The genus *Nepovirus* has been divided into three subgroups A, B and C based on genome length, genomic organization, serological relationships, proteinase cleavage sites and the phylogenetic relationship of their coat protein (CP) gene. GDefV with the new name *Nepovirus deformationis* belongs to subgroup A of the genus *Nepovirus* and is closely related to ArMV and GFLV. Prevalence of GFLV in the vineyards of Iran raises the possibility that a mixed infection of GFLV and GDefV is also present in these areas. In Khorasan-Razavi Province, Iran's third-largest grape production center, research has addressed grape-affecting viruses with potential economic consequences, including reduced yield and product quality. Studying the distribution and genetic diversity of GDefV and other grape viruses is crucial for developing effective management and prevention strategies in the region's vineyards. In this study, GDefV was identified in the vineyards of Khorasan-Razavi province in Northeastern Iran and its complete genome was sequenced. In addition, the phylogenetic relationship of these isolates to other GDefV isolates deposited in GenBank was analyzed.

Materials and Methods

Samples from three grapevines were collected from a vineyard in Kashmer, Khorasan-Razavi Province; total RNA was extracted from the petiole of young leaves using the CTAB-PVPP method., GDefV and mixed infections of GDefV/GFLV were detected by PCR using specific primers. The PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel and sequenced. The miRNAs were extracted from grapevine petiole tissue using the modified CTAB method, and small RNA libraries were prepared using the TruSeq Small RNA Sample Prep Kit and sequenced on the Illumina Novaseq 6000 platform. After trimming the reads, contigs were generated using k-mer 15 in Velvet assembler 0.7.31. Contigs were verified using BLASTn and BLASTx in NCBI, and reconstruction of the GDefV genome from the NGS reads was performed using CLC Genomics Workbench (CLC Bio) software. Phylogenetic

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.85726.1168

trees were generated in MEGA7 using the maximum likelihood (ML) method with 1000 replicates in the bootstrap test. The occurrence of possible recombinations in the GDefV genome was analyzed using the RDP v.6 package.

Results and Discussion

The samples showed leaf deformation, shortening of internodes, bushy growth, stunting and decline, but these symptoms are probably related to GFLV, and GDefV only causes leaf deformation in the infected vine. The PCR amplification and sequencing of a segment of the coat protein gene revealed a co-infection of GDefV and GFLV in the samples. GFLV is widely distributed in Iranian vineyards, GDefV has also been previously reported in the vineyards of northwestern Iran, but this is the first report of GDefV in the vineyards of Khorasan-Razavi Province.

After refining the reads, approximately 15 million reads (92-99.7% of the original reads) remained for further analysis. The read sequences of each library were deposited in the Sequence Read Archive (SRA) under the accession number SAMN33747579-81. Three Iranian GDefV isolates obtained from three miRNA libraries were deposited in GenBank (accession numbers **-**).

RNA1 and RNA2 of the three Iranian GDefV isolates had a length of 7386 and 3753 nucleotides, respectively. The RNA1 in GDefV had an open reading frame (ORF) of 6852 nucleotides in length, which started with the start codon AUG at position 288 and ended with the stop codons UAA or UAG at position 7142. The 5' end of the genome had 287 nucleotides long and contained two repeating sequences of 15 nucleotides that formed stem-loop structures. The length of the non-coding region at the 3' end had 244 nucleotides. Translation of RNA1 of the GDefV genome produces a polyprotein (p1) of 2285 amino acids (approximately 252 kda). The polyprotein p1 comprises the cofactor proteins proteinase, helicase, VPg, proteinase and polymerase with approximate weights of 45, 88, 3, 25 and 91 kDa, respectively. RNA2 also has one ORF, located between nucleotides 237 and 3560. This open reading frame also produces a 122 kDa polyprotein (P2) with 1108 amino acids. The second fragment of the GDeFV genome had 236 nucleotides as a 5'-noncoding region with three repeating sequences of 15 nucleotides that produced stem-loop structures with a 3-nucleotide loop and a 6bp stem. The 3'-noncoding region was also 193 nucleotides long. Polyprotein P2 comprised protein 2A, movement protein (MP) and coat protein (CP). The GDefV polyproteins had cysteine/alanine (C/A) and arginine/glycine (R/G) cleavage sites similar to those of the GFLV polyprotein. Comparison of the RNA1 sequences from three Iranian GDefV isolates with other GDefV isolates available in GenBank showed that the Iranian isolates had 88.1-92.2 % nucleotide identity with each other and 90.3-93.9 % with GenBank isolates at the nucleotide level. At the amino acid level, the Iranian isolates were 86.6-91.6 % identity with each other and 88.9-92.7 % with GenBank isolates. For RNA2, the Iranian isolates showed 89.4-92 % similar to each other and 89.6-94.2 % similar to GenBank isolates at the nucleotide level. The amino acid similarity between the Iranian GDefV isolates was 85-88.6 %. In the phylogenetic tree based on the nucleotide and amino acid sequences of RNA1 and RNA2 of the GDefV genome, the Iranian isolates of this study were clustered in a distinct clade than other GDefV isolates from Turkey (HE613269 and NC017939).

GDefV was reported in 2003 and no further information is available on its distribution in vineyards around the world. GDefV has already been reported from Turkey and Iran, but the complete genome sequence of the Iranian GDefV isolate is being reported for the first time. Further studies on the population diversity of GDefV isolates in different regions of Iran are required to gain more insight into the mechanisms affecting the dynamics of GDefV populations.

Keywords: Complete genome, Grapevine deformation virus, *Nepovirus*, Phylogeny, Small RNAs

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸ شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۱۸۱-۱۷۱

ردیابی و تجزیه و تحلیل ژنوم کامل ویروس بدشکلی برگ انگور (Grapevine deformation virus) از تاکستان‌های استان خراسان رضوی

زهرا غلام پور[۱]- محمد زکی عقل[۲*]- محسن مهرور[۲]- عزالدین سی امور[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۸

چکیده

نپوویروس‌ها عامل زوال عفونی مو در سراسر دنیا هستند. ویروس بدشکلی برگ انگور (Grapevine deformation virus-GDefV) با نام جدید *Nepovirus deformationis* به زیرگروه A جنس نپوویروس تعلق دارد. علائم GDefV به‌صورت بدشکلی برگ انگور، کوتولگی و زوال درختچه است. GDefV در اغلب موارد در آلودگی مخلوط با ویروس برگ بادبزنی مو مشاهده می‌شود. برای شناسایی و تعیین توالی ژنوم کامل GDefV سه نمونه انگور با علائم رشد کپه‌ای و زوال در بهار سال ۱۳۹۸ از شهرستان کاشمر در استان خراسان رضوی در شمال‌شرق ایران جمع‌آوری شدند. پس از استخراج RNA از دمبرگ برگ‌های جوان مو، شناسایی اولیه GDefV در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. سپس کتابخانه‌هایی از RNA های کوچک از سه تاک مورد بررسی تهیه و در پلت فرم ایلومینا تعیین توالی شدند. پس از پالایش خوانش‌ها، ۱۵ میلیون خوانش باکیفیت مناسب برای آنالیزهای پایین‌دست باقی ماندند. که از آن‌ها، ژنوم سه جدایه ایرانی GDefV به طول ۷۳۸۶ و ۳۷۵۳ نوکلئوتید بازسازی شد. مقایسه ترادف این جدایه‌ها با توالی‌های GDefV موجود در GenBank بیانگر شباهت ۹۴/۳-۸۷/۶ درصدی در سطح نوکلئوتیدی و ۹۰/۵-۸۸/۸ درصد در سطح آمینواسیدی بود. در درخت‌های فیلوژنتیک ترسیم‌شده، جدایه‌های شمال شرق ایران در شاخه‌ای مجزا از سایر جدایه‌های GDefV قرار گرفتند. مقاله حاضر اولین گزارش از تحلیل ژنوم و تبارزایی جدایه‌های GDefV از تاکستان‌های ایران را ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: ژنوم کامل، فیلوژنی، ویروس بدشکلی برگ انگور، RNA های کوچک، *Nepovirus*

مقدمه

ویروس‌های مو منجر به کاهش عملکرد و کیفیت محصول می‌شوند. تاکنون بیش از ۸۰ بیماری ویروسی از تاکستان‌های سراسر دنیا در انگور شناخته شده است (Fuchs, 2020). بیماری زوال مسری مو (Infectious degeneration) در ۱۹۷۰ از فرانسه گزارش شد و مشخص شده است که در تاکستان‌های سراسر دنیا شیوع دارد (Hewitt & Bovey, 1979). علائم بیماری به‌صورت ضعف و زوال درختچه‌ها، کوتولگی، کوتاهی میانگره‌ها، در برخی موارد همراه با علائم بدشکلی برگ ،پیسک، موزائیک یا حتی زردی برگ‌ها است. خوشه‌ها تنک و باردهی درخت بشدت کاهش می‌یابد (Eichmeier *et al.*, 2016). ویروس‌های برگ بادبزنی مو (Grapevine fanleaf virus, GFLV)، موزائیک آرابیس (Arabis mosaic virus, ArMV)، لکه حلقه‌ای گوجه‌فرنگی (Tomato ringspot virus, ToRSV) و لکه حلقه‌ای توتون (Tobacco ringspot virus, TRSV) متعلق به جنس نپوویروس به‌عنوان عوامل بروز زوال مسری مو گزارش شده‌اند (Martelli, 2017). اعضای جنس نپوویروس در رده Picornavirales، خانواده Secoviridae، زیرخانواده Comovirinae قرار دارند که بر اساس طول ژنوم، سازمان ژنومی، روابط سرولوژیکی، محل‌های برش پروتئیناز و تجزیه‌وتحلیل

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: zakiaghl@um.ac.ir)
۳- استاد مرکز تحقیقات و نوآوری، مؤسسه فوندازیون ادموند مخ، سان میکله آل آدیگ، ایتالیا

https://doi.org/10.22067/jpp.2024.85726.1168

فیلوژنتیکی ژن پروتئین پوششی (CP) به سه زیرگروه A، B و C تقسیم می‌شوند (Sanfacon *et al.*, 2011). ویروس بدشکلی برگ انگور (Grapevine Deformation Virus-GDefV) با نام جدید *Nepovirus deformationis* نخستین بار در ترکیه شناسایی شد (Cigsar *et al.*, 2003). GDefV متعلق به زیرگروه A جنس نپوویروس است و رابطه نزدیکی با ویروس موزائیک آرابیس (ArMV) و ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) به‌ویژه RNA2 دارد (Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.*, 2005). پروتئین پوششی GDefV با ArMV دارای ۷۲٪ شباهت بوده و ارتباط سرولوژیکی نزدیکی با یکدیگر دارند (Cigsar *et al.*, 2003). احتمال داده می‌شود که GDefV حاصل نوترکیبی بین ArMV و GFLV و تکامل واگرای آن باشد (Elbeaino *et al.*, 2012).

در ایران GDefV از تاکستان‌های استان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی و اردبیل ردیابی شده است (Hajizadeh *et al.*, 2012) لیکن اطلاعی از حضور آن در سایر نقاط ایران در دست نیست. همچنین تنها بخشی از پروتئین پوششی GDefV توالی‌یابی شده (Moradi *et al.*, 2018; Hajizadeh *et al.*, 2012) و اطلاعاتی از ژنوم کامل ویروس موجود نیست. با توجه به شیوع گسترده GFLV در تاکستان‌های شرق کشور (Gholampour *et al.*, 2015) این احتمال داده شد که آلودگی مخلوط GFLV و GDefV نیز در این مناطق وجود داشته باشد.

در استان خراسان رضوی که به‌عنوان سومین مرکز تولید انگور در ایران شناخته شده است، تحقیقاتی در مورد ویروس‌های آلوده کننده انگور انجام شده است. این ویروس‌ها می‌توانند تأثیرات اقتصادی قابل توجهی از طریق کاهش عملکرد و کیفیت محصول بر تولید انگور داشته باشند. درک توزیع و تنوع ژنتیکی GDefV و سایر ویروس‌های انگور در ایران می‌تواند به ارائه استراتژی‌های مدیریت و پیشگیری از بیماری در تاکستان‌های کشور کمک کند. در این مطالعه، GDefV از تاکستان‌های استان خراسان رضوی در شمال شرق ایران ردیابی و ژنوم کامل آن توالی‌یابی شده است. همچنین رابطه فیلوژنی این جدایه‌ها با سایر جدایه‌های GDefV موجود در GenBank تحلیل شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، استخراج RNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در بهار سال ۱۳۹۸ سه نمونه مو از شهرستان کاشمر در استان خراسان رضوی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج RNA از دمبرگ برگ‌های جوان مو به روش بهینه‌سازی شده CTAB-PVPP (Polyvinylpolypyrolidon) انجام شد (Gholampour & Zakiaghl, 2016).

سنتز رشته مکمل (cDNA) با مخلوط کردن چهار میکرولیتر از آران‌ای کل با یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی معکوس GDefV و GFLV، دو میکرولیتر مخلوط dNTPs، چهار میکرولیتر بافر 5X، و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Thermo-resistant H-MMuLV RT, Parstous) در حجم ۲۰ میکرولیتر و در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی GDefV-F/R و GFLV-F/R (جدول ۱) برای تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل سه میکرولیتر از cDNA، یک میکرولیتر از هر آغازگر و ۱۰ میکرولیتر از کیت PCR (Ampliqon Red Dye Master Mix، Denmark) بود. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک مرحله در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه دقیقه و ۳۵ چرخه، شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشت‌سازی، دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک مرحله ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر (Bio-Rad MJ Mini Thermal Cycler، USA) انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای GFLV و GDefV

Table 1- Specific primers used for GDefV and GFLV

نام پرایمر Primer name	توالی Sequence	اندازه قطعه Product size	ژن Gene	منبع Reference
GDefV -F	5'- CACTGCGACGTGGAACAATG -3'	500	Coat Protein	Moradi *et al.*, 2018
GDefV -R	5'- TTGTGCCCAGACTCCACATG -3'			
GFLV -F	5'- CGGCAGACTGGCAAGCTGT -3'	1000	Coat Protein	Gholampour *et al.*, 2015
GFLV -R	5'- GGTCCAGTTTAATTGCCATCCA -3'			

محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی دو میکرولیتر از Green Viewer (پارس توس، ایران) الکتروفورز و درنهایت با استفاده از دستگاه ژل‌داک (Alphaimager Mini ProteinSimple، USA) تصویربرداری شد. محصول PCR هر سه نمونه برای توالی‌یابی نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن (Macrogen) کره جنوبی ارسال شد.

ساخت کتابخانه ژنومی و توالی‌یابی و آنالیز داده‌ها

به روش اصلاح‌شده CTAB (Carra *et al.*, 2007) miRNA ها از یک گرم بافت برگ استخراج شدند. سپس RNA های کوچک از ژل پلی آکریل آمید بازیابی شدند. کتابخانه‌هایی از RNA های کوچک از سه تاک با استفاده از کیت TruSeq Small RNA Sample Prep (شماره کاتولوگ RS-930-1012) تهیه و در پلتفرم Illumina NovaSeq 6000 (United Kingdom ,Cambridge) تعیین توالی شدند.

کیفیت خوانش‌ها توسط FastQC (Andrews, 2010) بررسی گردید و آداپتورها با Cutadapt 1.9 (Martin, 2011) حذف شدند. بازسازی خوانش‌ها و تولید contig ها با استفاده از اسمبلر Velvet 0.7.31 با k-mer ۱۵ انجام شد (Zerbino & Birney, 2008). همسانی Contig های ساخته‌شده با ویروس‌های گیاهی توسط BLASTn و BLASTx، در NCBI، مورد بررسی قرار گرفت (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). سپس از جدایه مرجع GDefV که بیشترین همسانی را با Contig ها داشت، برای بازسازی ژنوم از خوانش‌های NGS در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (CLC Bio) استفاده شد. توالی‌های مشترک (consensus) به‌دست‌آمده در آنالیزهای پایین‌دست استفاده شدند.

تجزیه و تحلیل شباهت توالی نوکلئوتیدی و هم‌ردیف‌سازی چندگانه جدایه‌های این مطالعه و جدایه‌های موجود در GenBank با استفاده از نرم‌افزار MAFFT نسخه ۷ انجام شد. پس از انتخاب بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی در نرم‌افزار MEGA7، رسم درخت تبارزائی به روش Maximum-Likelihood (ML) با ۱۰۰۰ تکرار در آزمون بوت‌استرپ انجام شد.

بررسی بروز نوترکیبی احتمالی در ژنوم GDefV با استفاده از بسته نرم‌افزاری RDP v.5 (Martin *et al.*, 2021) با پارامترهای پیش‌فرض نرم‌افزار انجام شد.

بررسی آلودگی مخلوط GDefV و GFLV

به‌منظور بررسی آلودگی مخلوط GDefV و GFLV از آغازگرهای اختصاصی هر ویروس که قطعه‌ای از ژن پروتئین پوششی هر ویروس را همانندسازی می‌کنند (جدول ۱) استفاده شد و محصول PCR در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد.

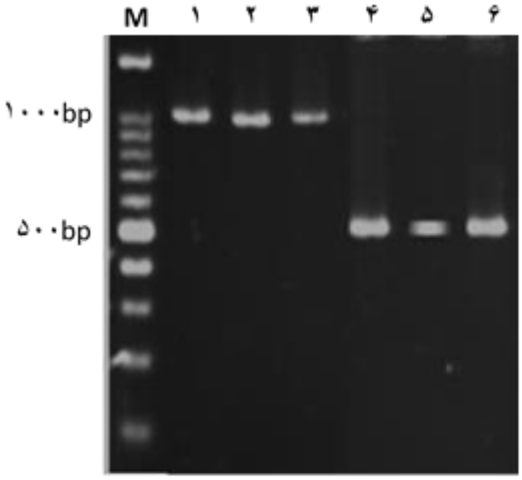
نتایج و بحث

در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده بدشکلی برگ، کوتاه شدن میانگره‌ها، رشد کپه‌ای و کوتولگی مشاهده شد (شکل ۱) این علائم احتمالا مربوط به GFLV است (Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017) و GDefV در تاک آلوده تنها بدشکلی در برگ ایجاد می‌کند (Cigsar *et al.*, 2003). همانندسازی قسمتی از پروتئین پوششی GDefV با آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تائید تطابق قطعه همانندسازی شده نشان‌دهنده آلودگی تاک‌ها به GDefV است. GDefV پیشتر از تاکستان‌های آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی و اردبیل در ایران گزارش شده است (Hajizadeh *et al.*, 2012) بنابراین این اولین گزارش از حضور GDefV در تاکستان‌های خراسان رضوی است. به‌علاوه در هر سه نمونه مورد بررسی آلودگی مخلوط GDefV و GFLV ردیابی شد (شکل ۲).



شکل ۱- علائم بدشکلی برگ، رشد کپه‌ای و کوتولگی در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از تاکستان‌های شهرستان کاشمر در استان خراسان رضوی
نمونه‌ها آلودگی مخلوط به GDefV و GFLV داشتند.

Figure 1- Leaf deformation, bushy growth and stunting symptoms were observed in the collected samples from the vineyards in Kashmar, Razavi Khorasan Province
The samples were contaminated with a mixed infection of GDefV and GFLV.



شکل ۲- الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل آگارز یک درصد با دو جفت آغازگر اختصاصی GDefV-F/R و GFLV-F/R. راهک ۱ تا ۳ تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی GFLV و راهک ۴ تا ۶ تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی GDefV. راهک M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌باز (فرمنتاز).

Figure 2– Results of RT-PCR products were analyzed on a 1% agarose gel using two pairs of specific primers, GDefV-F/R and GFLV-F/R

Lanes 1 to 3 represent the amplification of a segment of the GFLV coat protein gene, lanes 4 to 6 represent the amplification of a segment of the GDefV coat protein gene. M 100bp DNA ladder (Fermentas).

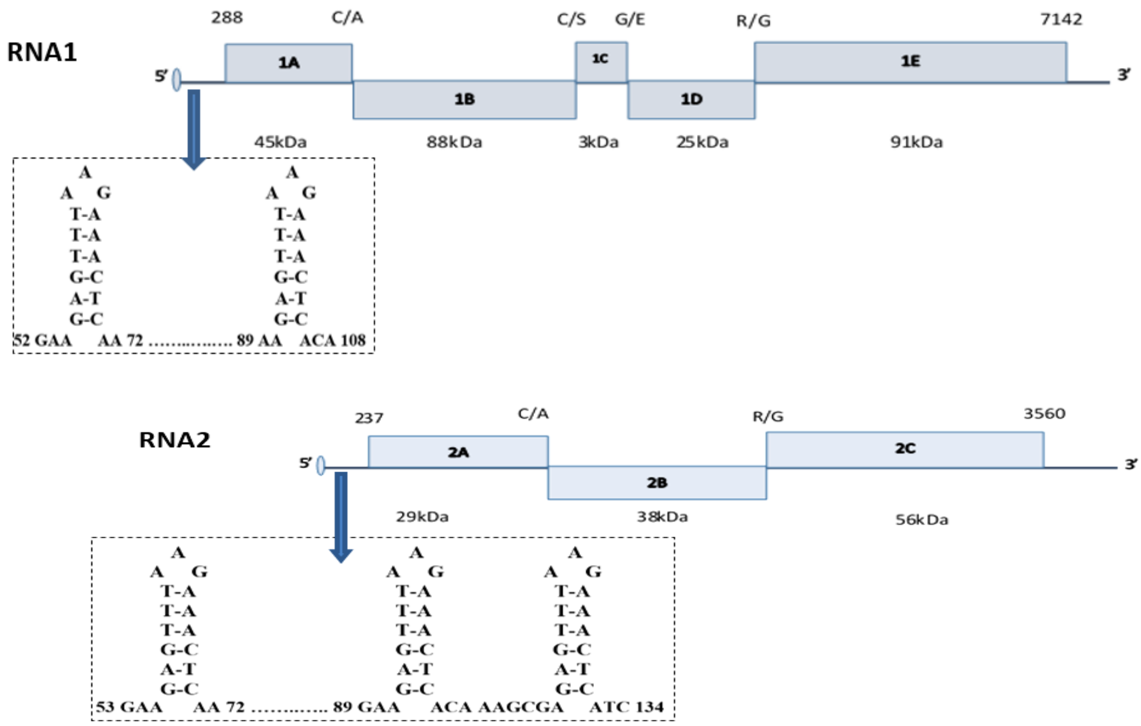
با حذف خوانش‌های باکیفیت پایین از کتابخانه‌های میکروآرایه‌ای توالی‌یابی شده حدود ۱۵ میلیون خوانش (۹۹٫۷٪-۹۲٪ از خوانش‌های اولیه) از هر کتابخانه برای آنالیزهای پایین‌دست باقی ماندند. توالی‌های بازیابی شده هر کتابخانه در Sequence Read Archive (SRA) با شماره دسترسی‌های SAMN33747579-81 ثبت شدند. از توالی مرجع از کشور ترکیه (NC017938, NC017939) برای بازسازی ژنوم کامل GDefV از خوانش‌های NGS استفاده شد. سه جدایه ایرانی GDefV به‌دست‌آمده از ۳ کتابخانه در GenBank با رس شمار PP187691–96 ثبت شدند.

قطعات ژنوم سه جدایه ایرانی GDefV توالی¬یابی شده به‌ترتیب ۷۳۸۶ و ۳۷۵۳ نوکلئوتید طول دارند. RNA1 در GDefV دارای یک چارچوب خوانش باز (ORF) به طول ۶۸۵۲ نوکلئوتید است که با کدون آغاز AUG در موقعیت ۲۸۸ شروع و به کدون‌های خاتمه UAA یا UAG در موقعیت ۷۱۴۲ ختم می‌شود. انتهای'۵ ژنوم ۲۸۷ نوکلئوتید طول دارد و شامل دو توالی تکراری ۱۵ نوکلئوتیدی است که توانایی ایجاد ساختارهای ساقه-حلقه (stem-loop) را دارند. این ساختار پیشتر نیز برای GDefV گزارش‌شده است (Wetzel et al., 2001). ناحیه غیررمزگذاری‌کننده در انتهای'۳ نیز دارای ۲۴۴ نوکلئوتید است. ترجمه چارچوب خوانش باز RNA1 از ژنوم GDefV، یک پلی‌پروتئین (P1) با ۲۲۸۵ اسیدآمینه (حدود ۲۵۲ کیلو دالتون) تولید می‌کند. پلی پروتئین P1 شامل پروتئین‌های کوفاکتور پروتئیناز، هلیکاز، VPg، پروتئیناز و پلیمراز به‌ترتیب با وزن‌های تقریبی ۴۵، ۸۸، ۳، ۲۵ و ۹۱ کیلو دالتون است. محل‌های برش بین این پروتئین در P1 مشابه با GFLV است (Wetzel et al., 2008)، که در شکل ۳ نمایش داده شده است.

RNA2 دارای یک چارچوب خوانش باز است. منطقه رمزگذاری کننده بین نوکلئوتیدهای ۲۳۷ تا ۳۵۶۰ قرار داشت. این چارچوب خوانش باز نیز یک پلی‌پروتئین (P2) به وزن ۱۲۲ کیلو دالتون با ۱۱۰۸ اسیدآمینه تولید می‌کند. قطعه دوم ژنوم GDefV نیز ناحیه غیر رمزگذاری کننده '۵ به طول ۲۳۶ نوکلئوتید و شامل سه توالی تکراری ۱۵ نوکلئوتیدی بود که ساختارهای ساقه-حلقه (stem-loop) حاوی یک حلقه ۳ نوکلئوتیدی و ساقه ۶ جفت بازی را تولید می‌کردند (Wetzel et al., Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2005; 2001). ناحیه غیر رمزگذاری کننده '۳ نیز ۱۹۳ نوکلئوتید طول داشت. پلی‌پروتئین P2 شامل پروتئین 2A، پروتئین حرکتی (MP) و پروتئین پوششی (CP) بود. پلی پروتئین‌های GDefV دارای مکان‌های برشی Cysteine/Alanine (C/A) و Arginine/Glycine (R/G) مشابه با پلی‌پروتئین GFLV بودند (Margis et al., 1993) (شکل ۳).

مقایسه توالی سه جدایه GDefV توالی¬یابی شده به همراه RNA1 و RNA2 دو جدایه موجود در GenBank نشان داد که همسانی نوکلئوتیدی RNA1 جدایه‌های ایرانی با یکدیگر ۸۷/۶ – ۹۲/۲ درصد و با جدایه‌های GenBank ۹۲/۹ – ۹۴/۳ درصد بود. در سطح آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی با یکدیگر ۹۰/۶ – ۹۱/۶ درصد و با جدایه‌های GenBank ۹۲/۱ – ۹۲/۸ درصد شباهت داشتند.

جدایه‌های ایرانی با یکدیگر در RNA2 در سطح نوکلئوتیدی ۹۰/۸ – ۹۲/۷ درصد و با جدایه‌های GenBank ۹۲/۷ – ۹۴/۲ درصد شباهت داشتند. همسانی آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی GDefV با یکدیگر ۸۶/۶–۸۸/۶ درصد و با سایر جدایه‌های GDefV ۸۸/۸ – ۹۰/۵ درصد بود (شکل ۴).



شکل ۳- شماتیک سازماندهی ژنوم DefV

هر یک از قطعات ژنوم با یک جعبه نمایش داده شده است. انتهای '۵ و '۳ با خط مشخص شده‌اند. VPg به‌صورت دایره آبی در ابتدای ژنوم و ساختارهای ساقه–حلقه (stem-loop) انتهای'۵ ژنوم در زیر هر قطعه نشان داده شده است. وزن مولکولی پروتئین‌های رمزگذاری شده به‌وسیله RNA1 و RNA2 ژنوم GDefV در زیر جعبه‌ها ذکر شده است. 1A: پروتئیناز، 1B: هلیکاز، 1C: VPg، 1D: پروتئیناز، 1E: پلیمراز، 2A: پروتئین خانگی، 2B: پروتئین حرکتی و 2C: پروتئین پوششی. مکان‌های برش بین دو آمینواسید بالای جعبه‌ها نشان داده شده است.

Figure 3- Schematic organization of the GDefV genome

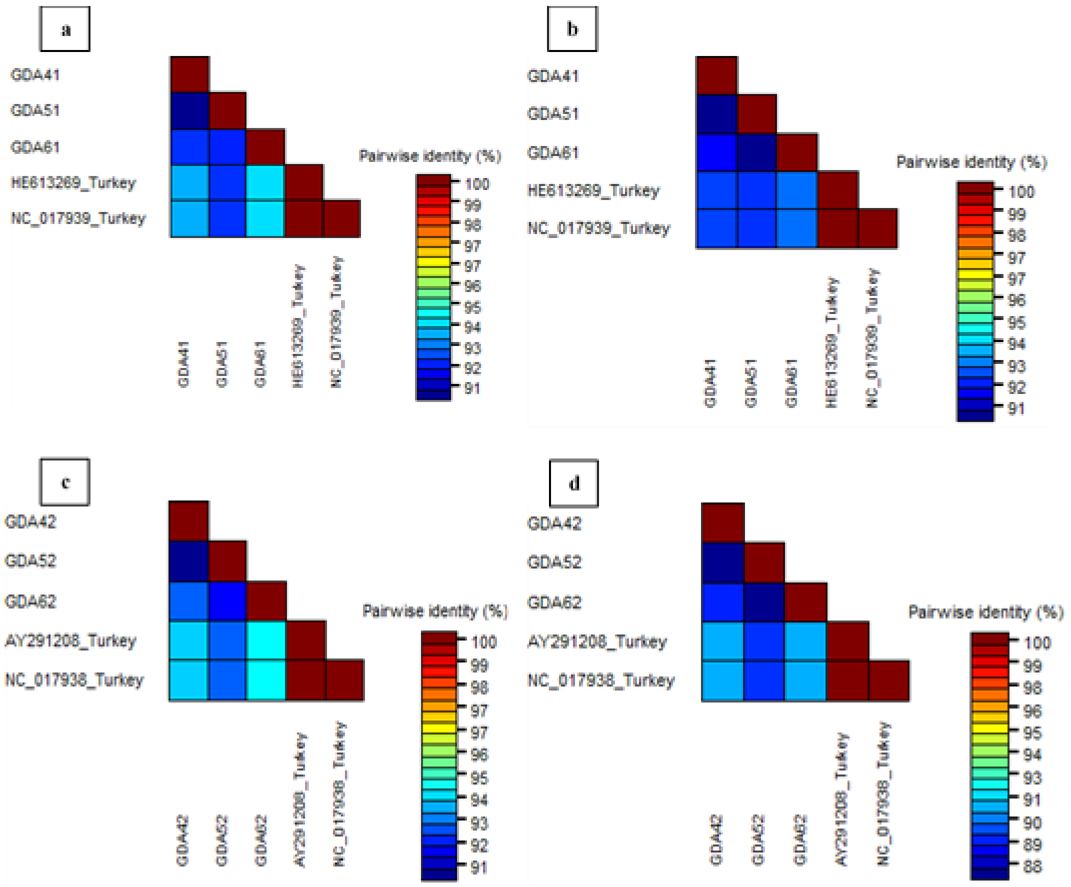
The ORF of each genomic RNA is displayed in a box. The '5 and '3 ends are indicated by a line. The VPg is shown as a blue circle at the beginning of the genome and stem-loop structures at the '5 end of the genome are shown below each piece. The molecular masses of proteins encoded by RNA1 and RNA2 of the GDefV genome is mentioned below the boxes. 1A: putative proteinase cofactor, 1B: putative Helicase, 1C: viral genome-linked protein, 1D: proteinase, 1E: putative RNA-dependent RNA polymerase, 2A: homing protein, 2B: movement protein, and 2C: coat protein. The cleaved sites are indicated as dipeptide above the boxes.

میزان شباهت نوکلئوتیدی جدایه‌های GDefV در RNA1 و RNA2 ژنوم به‌ترتیب ۸۷/۶–۹۴/۳ و ۹۰/۸–۹۴/۲ درصد بود. میزان شباهت نوکلئوتیدی در ژن پروتئین پوششی کلیه جدایه‌های GDefV ۱۰۰ –۸۹/۷ درصد بود.

جدایه GDA62 به‌عنوان جدایه نوترکیب شناسایی شد (جدول ۲). رویداد نوترکیبی بین گونه‌ای در قسمت C ترمینال ژن CP ردیابی شد و جدایه‌های GFLV-F13 و ArMV-NW به‌عنوان والدین احتمالی مشابه با نتایج البیاینو و همکاران (Elbeaino *et al.*, 2012) هستند. این سایت نوترکیبی با حداقل ۵ روش مختلف در بسته نرم‌افزاری RDP5 پیش‌بینی شده است.

در درخت فیلوژنی بر اساس توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی RNA1و RNA2 ژنوم GDefV جدایه‌های ایرانی توالی‌یابی شده در این مطالعه در گروهی مجزا از دو جدایه دیگر این ویروس که از ترکیه (HE613269 و NC017939) گزارش‌شده‌اند قرار گرفتند (شکل ۵ a و b). درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی پروتئین پوششی GDefV نیز توپولوژی

مشابه با درخت ژنوم کامل داشت و جدایه‌های این مطالعه مجزا از دو جدایه دیگر گزارش‌شده از ایـران (MG763926 و MW054857) و ترکیــه (AY291208، AY233975 و NC017938) قـرار گرفتنـد (شکل c۵).



شکل ٤- ماتریس مقایسه دوبه‌دو ترادف‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژنوم کامل GDefV (a RNA1 در سطح نوکلئوتیدی b) RNA1 در سطح آمینواسیدی c) RNA2 در سطح نوکلئوتیدی d) RNA2 در سطح آمینواسیدی

Figure 4- Pair-by-pair comparison matrix of nucleotide and amino acid of the complete GDefV genome a) RNA1 at the nucleotide level b) RNA1 at the amino acid level c) RNA2 at the nucleotide level d) RNA2 at the amino acid level using SDT v1.2 software

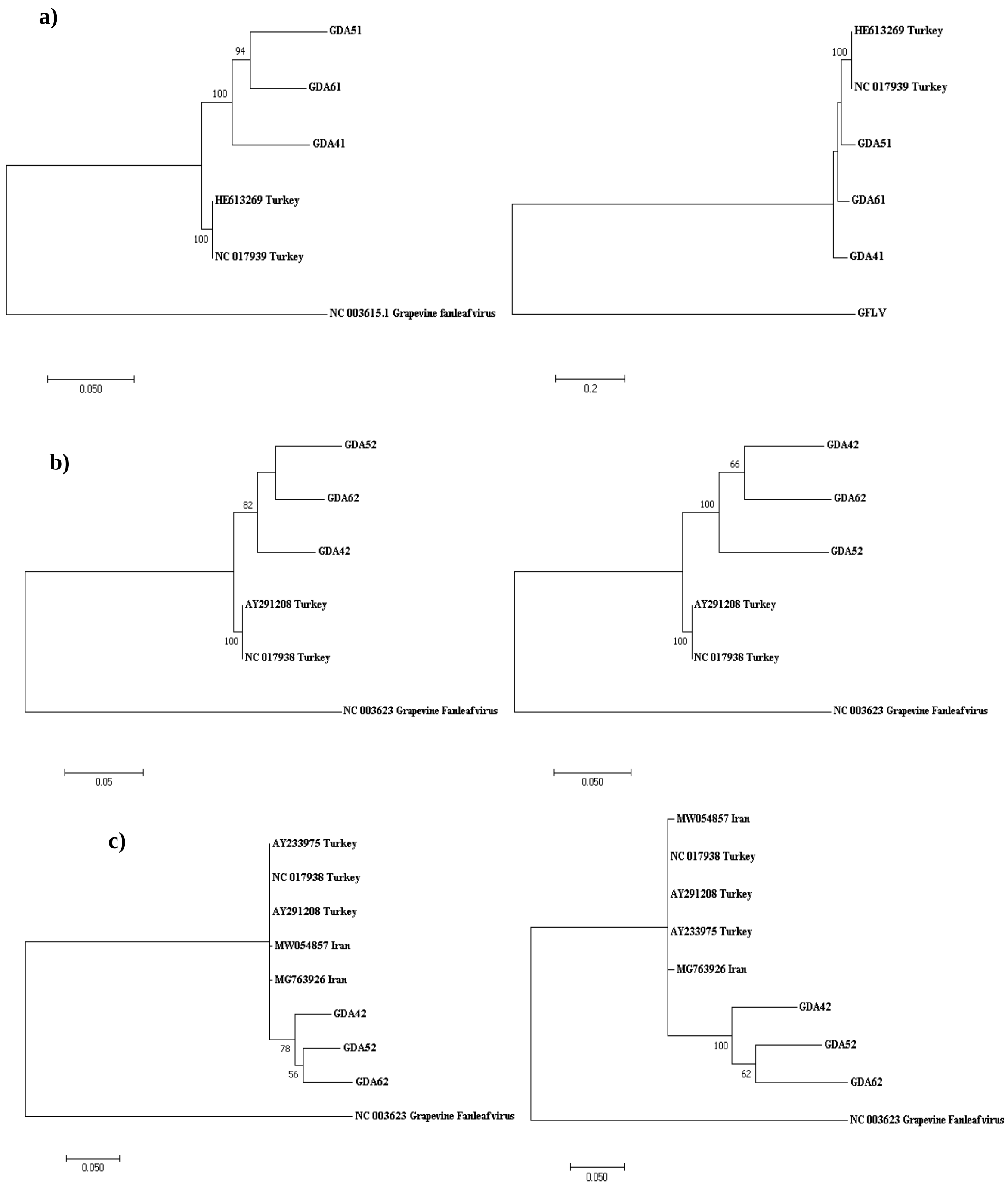
جدول ۲- بررسی وقوع نوترکیبی در توالی کامل ژنوم RNA2 جدایه‌های GDefV با استفاده از RDP5

Table 2- Recombination crossover events in of GDefV-RNA2 detected by the Recombination detecting program RDP5

توالی نوترکیب Rec. Seq.	محل ژن Gene region	موقعیت نوکلئوتید Nt. Position	ایزوله‌های والد (اصلی × فرعی) Parental isolates (Major × minor)	ضریب احتمال در نرم‌افزار RDP5 RDP5 (P value)[a]
GDA62	2C	3377-3500	GFLV-F13 × ArMV-NW	RGBMC3sSL

a) RDP5-implemented methods supporting the corresponding recombination sites: R (RDP), G (GENECONV), B (BOOTSCAN), M (MAXCHI), C (CHIMAERA), 3Seq (3s), S (SISCAN) and L (Lard)

a) روش‌های بکاربرده شده در RDP5 که از جایگاه‌های نوترکیبی پشتیبانی می‌کنند: R (RDP)، G (GENECONV)، B (BOOTSCAN)، M (MAXCHI)، C (CHIMAERA)، 3Seq (3s)، S (SISCAN) و L (Lard).



شکل ۵- درخت تبارزائی جدایه‌های ویروس بدشکلی برگ انگور بر اساس توالی نوکلئوتیدی (سمت چپ) و آمینواسیدی (سمت راست) RNA1 (a) RNA2 (b) و ژن پروتئین پوششی GDefV (c) با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 ترسیم‌شده است

مقادیر بوت‌استراپ (۱۰۰۰ تکرار) بر شاخه‌ها نشان داده شده است. ویروس برگ بادبزنی مو (GFLV) به‌عنوان گروه خارجی استفاده شد.

Figure 5. ML phylogenetic tree of the isolates of the GDefV is drawn based on the nucleotide sequence (left side) and amino acid sequence (right side) of RNA1 (a), RNA2 (b), and the GDefV coat protein gene (c) using the MEGA7 software.
Bootstrap values (1000 repetitions) are shown on the branches. Grapevine fanleaf virus (GFLV) was used as an outgroup.

ویروس بدشکلی برگ انگور در ۲۰۰۳ از ترکیه گزارش شده است (Cigsar et al., 2003) و اطلاع چندانی از پراکنش آن در تاکستان‌های دنیا دسترس نیست. GDefV تاکنون از ترکیه (Cigsar et al., 2003) و ایران (Hajizadeh et al., 2012) گزارش‌شده است، ولی تاکنون توالی کامل ژنوم جدایه ایرانی GDefV در دسترس نبود و در این تحقیق برای اولین بار ژنوم GDefV تعیین توالی شده است. در این بررسی جدایه‌های توالی‌یابی شده GDefV در شاخه‌ای جدا از جدایه‌های ترکیه قرار گرفتند. این امر ممکن است ناشی از جدایی جغرافیایی بین جدایه‌های ایرانی و سایر جدایه‌های GDefV باشد به این معنی که جدایی جغرافیایی می‌تواند بر روند تکاملی ویروس تأثیر بگذارد ولی با توجه به وجود داده‌های اندک نیاز به بررسی بیشتری است. در رابطه با ویروس برگ بادبزنی مو که رابطه نزدیکی با GDefV دارد نیز اثر جدایی جغرافیایی بر مسیر تکاملی ویروس پیشتر گزارش‌شده است (Sokhandan-Bashir et al., 2007; Gholampour et al., 2017).

در حال حاضر، نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه تنوع جمعیت جدایه‌های GDefV در مناطق مختلف ایران وجود دارد تا شواهد بیشتری درباره مکانیسم‌های مؤثر بر پویایی جمعیت‌های GDefV ازجمله انتخاب مثبت و منفی، ترکیب ژنتیکی و تأثیر تبادل مواد گیاهی آلوده بین مناطق جغرافیایی مختلف ارائه شود. این یافته‌ها به توسعه راهکارهای مؤثرتری برای تشخیص و مدیریت GDefV کمک خواهند کرد.

References

1. Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Digiaro, M., & Martelli, G.P. (2005). Complete nucleotide sequence of the RNA-2 of Grapevine deformation and Grapevine Anatolian ringspot viruses. *Virus Genes*, *30*, 335-340. https://doi.org/10.1007/s11262-005-6776-5
2. Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Retrieved from http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
3. Carra, A., Gambino, G., & Schubert, A. (2007). A cetyltrimethylammonium bromide-based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. *Analytical Biochemistry*, *360*(2), 318-320. https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.022
4. Cigsar, I., Digiaro, M., Gokalp, K., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., De Stradis, A., Boscia, D., & Martelli, G.P. (2003). Grapevine deformation virus, a novel nepovirus from Turkey. *Journal of Plant Pathology*, *85*(3), 183-191.
5. Eichmeier, A., Komínková, M., Komínek, P., & Baránek, M. (2016). Comprehensive virus detection using next generation sequencing in grapevine vascular tissues of plants obtained from the wine regions of Bohemia and Moravia (Czech Republic). *PLoS ONE*, *11*(12), e0167966. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167966
6. Elbeaino, T., Digiaro, M., Ghebremeskel, S., & Martelli, G.P. (2012). Grapevine deformation virus: completion of the sequence and evidence on its origin from recombination events between Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Virus Research*, *166*(1-2), 136-140. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.011
7. Fuchs, M. (2020). Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology*, *102*(3), 643-653. https://doi.org/10.1007/s42161-020-00579-2
8. Gholampour, Z., Kargar, M., Zakiaghl, M., Siampour, M., Mehrvar, M., & Izadpanah, K. (2017). Dynamics of the population structure and genetic variability within Iranian isolates of grapevine fanleaf virus: evidence for polyphyletic origin. *Acta Virologica*, *61*(3), 324-335. https://doi.org/10.4149/av_2017_311
9. Gholampour, Z., & Zakiaghl, M. (2016). Comparison of RNA extraction methods for the identification of Grapevine fan leaf virus. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *30*(1), 127-133. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jpp.v30i1.40075
10. Gholampour, Z., Zakiaghl, M., Jafarpour, B., & Mehrvar, M. (2015). Identification and prevalence of Grapevine fanleaf virus in Khorasan-Razavi vineyards. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *29*(3), 318-324. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jpp.v29i3.27668
11. Grassi, F., & De Lorenzis, G. (2021). Back to the origins: Background and perspectives of grapevine domestication. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4518. https://doi.org/10.3390/ijms22094518
12. Hajizadeh, M., Sokhandan-Bashir, N., & Elbeaino, T. (2012). First report of Grapevine deformation virus and Grapevine Anatolian ring spot virus in Iran. *Journal of Plant Pathology*, *94*(S4), 96.
13. Hewitt, W.B., & Bovey, R. (1979). The viroses and virus-like diseases of the grapevine. *Vitis*, *18*(3), 316-376.
14. Margis, R., Ritzenthaler, C., Reinbolt, J., Pinck, M., & Pinck, L. (1993). Genome organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA2 deduced from the 122K polyprotein P2 in vitro cleavage products. *Journal of General Virology*, *74*(9), 1919-1926. https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-9-1919
15. Martelli, G.P. (2017). An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. p. 31-46. In: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. New York.
16. Martin, D.P., Varsani, A., Roumagnac, P., Botha, G., Maslamoney, S., Schwab, T., Kelz, Z., Kumar, V., &

Murrell, B. (2021). RDP5: a computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evolution*, *7*(1), veaa087. https://doi.org/10.1093/ve/veaa087

17. Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, *17*(1), 10. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200
18. Moradi, R., Koolivand, D., Eini, O., & Hajizadeh, M. (2018). Molecular identification of four important nepovirus from vineyards of Zanjan province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, *49*(1), 99-110. (In Persian). https://doi.org/10.22059/ijpps.2018.246930.1006816
19. Reynolds, A.G. (2017). The grapevine, viticulture, and winemaking: A brief introduction. p. 3-29. In: Meng B., Martelli G.P., Golino D.A., Fuchs M. (eds) *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. Cham.
20. Sanfaçon, H., Iwanami, T., Karasev, A.V., van der Vlugt, R., Wellink, J., Wetzel, T., & Yoshikawa, N. (2012). Secoviridae. p. 881-899. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (eds) *Virus Taxonomy*. Elsevier.
21. Schmitt-Keichinger, C., Hemmer, C., Berthold, F., & Ritzenthaler, C. (2017). Molecular, cellular, and structural biology of *Grapevine fanleaf virus*. In *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (pp. 83-107): Springer International Publishing.
22. Sokhandan Bashir, N., Zarghani, S.N., & Hejazi, M.S. (2007). Diversity of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran. *Virus Research*, *128*(1-2), 144-148. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.04.013
23. Wetzel, T., Chisholm, J., Bassler, A., & Sanfacon, H. (2008). Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology*, *375*(1), 159-169. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.046
24. Wetzel, T., Meunier, L., Jaeger, U., Reustle, G.M., & Krczal, G. (2001). Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates of Grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus Research*, *75*(2), 139-145. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00235-0
25. Zerbino, D.R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, *18*(5), 821-829. https://doi.org/10.1101/gr.074492.107